

Experimentelle Untersuchungen
zur Hyaluronidasehemmung durch
Acetylcholin

München 1959

von

HANS JOACHIM KRAMER

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität

München

Direktor: Professor Dr. W. Seitz

Experimentelle Untersuchungen zur
Hyaluronidasehemmung durch Acetylcholin

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfasst und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Hans Joachim Kramer

aus

Düsseldorf



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Professor Dr. W. Seitz

Dekan: Professor Dr. K. Kolle

Tag der Mündlichen Prüfung: 28.7.59

Inhaltsverzeichnis

Problematik	4
Eigene Versuche	7
Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse ...	20
Diskussion	40
Zusammenfassung	42
Literaturverzeichnis	44



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555221_0041

Problematik

In früheren Arbeiten haben M a t h i e s ¹⁻⁵ und Mitarbeiter ⁶⁻⁹ festgestellt, dass die hyaluronidasehemmende Wirkung der Salizylate, Pyrazolone, Glukokorticoide und Moorbäder an eine Nebennierenmarkfunktion gebunden zu sein scheint. Im einzelnen haben die Versuche gezeigt, dass der hyaluronidasehemmende Effekt der geprüften Substanzen bei adrenalektomierten Ratten ausbleibt, bei hypophysectomierten Tieren dagegen erhalten ist. Diese Tatsache spricht zunächst für die Notwendigkeit der Anwesenheit der Nebenniere hinsichtlich des Zustandekommens der Hemmung der Hyaluronidaseaktivität. Nach Untersuchungen von D o m e n j o z ¹⁰, M a t h i e s ⁵ und J u n g ¹¹ bleibt der Ascorbinsäuredepletionseffekt, der bei intakten Ratten deutlich ist, nach Applikation der untersuchten Stoffe bei hypophysectomierten Ratten aus. Nach S a y e r s und S a y e r s ¹² ist die Abnahme des Ascorbinsäuregehaltes der Nebenniere als Ausdruck der inkretorischen Funktion der Nebenniere anzusehen. Da aber dieser Depletionseffekt unter den geprüften hyaluronidasehemmenden Substanzen bei hypophysectomierten Ratten nicht feststellbar ist, obwohl gleichzeitig die Hemmung der Hyaluronidaseaktivität festgestellt werden kann, dürfte eine Stimulierung der Nebennierenrinde nicht für das Zustandekommen der Hyaluronidasehemmung verantwortlich gemacht werden können. Es blieb demnach anzunehmen, dass die Anwesenheit des Nebennierenmarkes vermutlich mit einer Katecholaminausschüttung für das Zustandekommen der Hyaluronidasehemmung erforderlich ist. Diese Ansicht wurde durch die Untersuchungsergebnisse von M a t h i e s ¹³,

S c h e u f e l e ¹⁴ und S c h m i d t ¹⁵ gestützt, nach denen die Nebennierenmark-Katecholamine Adrenalin und Arterenol sowohl bei intakten als auch bei adrenaletomierten Ratten eine Hyaluronidasehemmung deutlich werden lassen.

Nach Gabe von Ergotamintartrat bzw. Regitin als Adrenalytica bleibt der hyaluronidasehemmende Effekt sowohl der Nebennierenmark-Katecholamine als auch der hyaluronidasehemmenden Substanzen nach Untersuchungen von M a t h i e s ¹⁶ und Mitarbeitern ^{15, 17, 18} aus. Auch diese Tatsache spricht bedingt für einen Wirkungsablauf über das Nebennierenmark, genauso wie auch die Tatsache einer Blockierung der Hyaluronidasehemmung, z.B. des Natriumsalizylates durch Ganglienblocker (M a t h i e s ¹⁹ und S c h w a l b a c h ²⁰).

Die Untersuchungen von S c h e u f e l e ¹⁴ haben ferner ergeben, dass die hyaluronidasehemmende Wirkung nicht während der primären, an der Pupillenweite sichtbaren Katecholamin-Wirkung auftritt, sondern erst zu einem Zeitpunkt, zu dem das zugeführte Adrenalin bereits abgebaut ist.

Um die hier vorliegenden Verhältnisse näher aufzuklären, haben M a t h i e s ²¹ und S c h l i e r f ⁸ adrenaletomierten Ratten Adrenalin-Dauerinfusionen über 2 Stunden appliziert und festgestellt, dass auch hier die Hyaluronidasehemmung erst in einem gewissen Zeitabstand nach Absetzen der Infusion auftritt. Wenn während dieser Dauerinfusion "Spitzen" einmaliger höherer Adrenalin-dosierungen gesetzt werden, tritt eine Hyaluronidasehemmung bereits während der Dauerinfusion im Anschluss an diese "Spitzen" auf. Es wird demnach angenommen, dass eine Hyaluronidasehemmung immer dann sichtbar wird, wenn ein höherer Adrenalinblutspiegel auf

ein niedrigeres Niveau absinkt. Die Anwesenheit von Adrenalin-oxydationsprodukten kann hierbei nicht massgebend sein, da diese während einer der genannten Adrenalin-Dauerinfusionen bereits ausreichend zur Verfügung stehen. Der hier vorliegende Wirkungsmechanismus ist noch nicht restlos geklärt. Auf balneologischem Gebiet haben z.B. F e l l i n g e r und S c h m i d ²² beschrieben, dass nach Bädern ein antirheumatischer Effekt erst während einer auf eine primäre sympatiktone Phase folgenden Gegenregulation im vagalen Sinne deutlich wird.

Es besteht demnach die Möglichkeit des Auftretens der Hyaluronidasehemmung in der vegetativen "Gegenregulationsphase" auf eine Katecholamin-Ausschüttung. Um diese Frage zu klären hat S c h l i e r f ⁸ adrenaletomierten Ratten 1 mg Acetylcholin + 5 μ Prostigmin als Cholinesterasehemmer appliziert.

Da in diesen Versuchen keine Hyaluronidasehemmung sichtbar wurde, war eine vagale Reaktionslage als Vorbedingung einer Hyaluronidasehemmung auszuschliessen, zumindest ist durch die primäre Einstellung einer vagalen Phase eine Hyaluronidasehemmung nicht hervorgerufen.

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen haben M a r q u a r d t und Mitarbeiter ²³ eine deutliche antiphlogistische Wirkung auf Acetylcholin, allerdings bei intakten Tieren, beschrieben. Die Verhältnisse der Hyaluronidasehemmung und der antiphlogistischen Wirkung scheinen nach Versuchen von D o m e n j o z ¹⁰ ähnlich zu liegen. Hiernach fällt die antiphlogistische Wirkung der gleichen Stoffe, wie sie M a t h i e s ¹⁻⁵ und Mitarbeiter ⁶⁻⁹ an der Hyaluronidasehemmung untersuchten, auch bei adrenaletomierten Ratten aus. ist

dagegen bei hypophysektomierten Ratten erhalten. S c h l i e r f ⁸ hat seine Versuche bezüglich der Hyaluronidasehemmung durch Acetylcholin + Prostigmin bewusst an adrenalektomierten Ratten durchgeführt, um vor reaktiven Katecholamin-Ausschüttungen aus dem Nebennierenmark sicher zu sein. Nach Bekanntwerden der genannten Untersuchungen von M a r q u a r d t und Mitarbeitern ²³ war es interessant zu prüfen, ob Acetylcholin + Prostigmin bei intakten Ratten eine Hyaluronidasehemmung sichtbar werden lässt. A r i s ²⁴ nimmt an, dass Dimethylaminoäthanol einen Acetylcholinaccelerator darstellt. Wenn diese Annahme zutrifft, müsste diese Substanz bezüglich der Hyaluronidasehemmung die gleichen Effekte wie Acetylcholin erzielen. In Zusatzversuchen sollten deshalb die hier vorliegenden Verhältnisse geprüft werden.

Eigene Versuche

Methodik

Es wurden männliche, weisse Ratten im Gewicht von 150 - 200 g verwendet. Die Hyaluronidasehemmung wurde durch Anwendung des Spreading-Testes gemessen und errechnet. Die Versuche wurden in Evipannarkose durchgeführt (30 mg Evipan-Natrium/100 g Tier s.c.), wobei nach W i l h e l m i ²⁵ kein störender Einfluss auf die Hyaluronidaseaktivität entsteht. Es wurden zunächst je eine intrakutane Quaddel von 0,1 ccm einer 0,6%igen Evansblaulösung und eine Farbstoff- + Hyaluronidasequaddel gesetzt. Zur Herstellung der Farbstoff- + Hyaluronidaselösung wurde eine Trockenampulle Hyaluronidase (Kinetin), enthaltend 150 IE., in 2 ccm der obengenannten 0,6%igen Evansblaulösung gelöst, so dass bei der Injektion von

0,1 ccm 7,5 IE. zur Wirkung kamen. Das Setzen der Quaddeln erfolgte streng intrakutan mit einer dünnen Kanüle in die mit Pilca enthaarte Bauchhaut. 10 Minuten nach der Injektion wurde die Diffusionsgeschwindigkeit der Farbstoff- sowie der Farbstoff- + Hyaluronidasequaddel an der erreichten Ausbreitung registriert, indem die Konturen auf einen Celluloidstreifen übertragen und planimetrisch ausgemessen wurden. Weitere Quaddelpaare der obengenannten Lösungen wurden zu verschiedenen Zeiten nach i.v. Injektion der auf ihre Hyaluronidasehemmung zu prüfenden Substanzen gesetzt und jeweils nach 10 Minuten abgelesen. Nach M a d i n a v e i t i a ²⁶ verläuft das Spreading zweiphasig und lediglich die innerhalb der ersten 10 Minuten ablaufende Reaktion ist sicher ein echter Effekt der Hyaluronidase. G i b b i a n ²⁷ ist der Ansicht, dass die durch Hyaluronidase verstärkte aktive Diffusion einer intrakutan gesetzten Quaddel auf dem Druck beruht, den das Flüssigkeitsdepot auf seine Umgebung ausübt. Nach Ablauf der ersten 10 Minuten dürften dann Resorptionsmechanismen im Vordergrund stehen.

Bei den Versuchen mit Dimethylaminoäthanolglutamat an adrenalektomierten Tieren wurden die Operationen in Äthernarkose durchgeführt. Die Tiere wurden anschliessend mit Hafermark und Zuckerkohlehydratreich ernährt und erhielten zur Aufrechterhaltung des Ionenhaushaltes physiol. NaCl-Lösung als Trinkflüssigkeit. Die adrenalektomierten Tiere wurden 48 Stunden nach dem Eingriff in Versuch genommen, da nach Untersuchungen von K a r g ²⁸ aufgrund von Messungen des nebennierenbedingten Grundumsatzes und der Ergebnisse des Thorn-Testes in dieser Zeit eine Regeneration von funktionstüchtigem akzessorischem Nebennierengewebe kaum zu befürchten ist. Innerhalb von 2 - 4 Tagen nach der Adrenalektomie zeigt

der Grundumsatz sein Minimum und der Thorn-Test ist negativ. Der Wiederanstieg des Grundumsatzes tritt erst nach dieser Zeit in Erscheinung. C a n a l i s ²⁹ sah bei Hunden und Kaninchen erst 2 Tage nach Teiladrenalektomie die erste Zunahme der Mitosen.

Nach den Untersuchungen, die S c h l i e r f ⁸ an a d r e n a l - e k t o m i e r t e n Tieren durchführte (Tabellen 1 und 2, und Abb. 1), wurde die Hyaluronidasehemmung nunmehr an i n t a k t e n Tieren nach i.v. Gabe von 0,2 mg Acetylcholin + 1 γ Prostigmin/100 g Tier nach 0, 45, 60, 90 und 120 Minuten geprüft.

1. Versuchsreihe

Es wurden bei intakten Ratten zunächst reine Farbstoffquaddeln und Farbstoff+Hyaluronidasequaddeln in obenangegebener Zusammensetzung bzw. Verdünnung gesetzt und deren Ausbreitung nach Ablauf von 10 Minuten gemessen. Sodann wurden 0,2 mg Acetylcholin + 1 γ Prostigmin/100 g Tier in 0,2 ml physiol. NaCl-Lösung intravenös injiziert. In dieser Versuchsreihe wurden zugleich mit der intravenösen Injektion je eine Farbstoff- und Farbstoff+Hyaluronidasequaddel gesetzt und nach 10 Minuten abgelesen. Ein weiteres Quaddelpaar der angegebenen Lösungen wurde 45 Minuten nach der i.v. Injektion gesetzt und ebenfalls nach 10 Minuten abgelesen. Die Ergebnisse zeigen Tabelle 3 und Abbildung 2.

2. Versuchsreihe

Die Methodik ist die gleiche wie bei der ersten Versuchsreihe, es wurden lediglich die Bestimmungszeiten der Hyaluronidasehemmung auf 15 und 60 Minuten nach Gabe von 0,2 mg Acetylcholin + 1 γ Prostigmin i.v. festgesetzt. Die Ergebnisse zeigen Tabelle 4 und Abbildung 2.

3. Versuchsreihe

Gleiche Methodik wie bei der vorigen Versuchsreihe. Diesmal wurde die Hyaluronidasehemmung 45 und 60 Minuten nach i.v. Gabe von 0,2 mg Acetylcholin + 1 γ Prostigmin i.v. bestimmt. Diese Ergebnisse zeigen Tabelle 5 und Abbildung 2.

4. Versuchsreihe

Gleiche Methodik. Es wurde die Hyaluronidasehemmung 90 und 120 Minuten nach Gabe von 0,2 mg Acetylcholin + 1 γ Prostigmin i.v. bestimmt. Die Ergebnisse zeigen Tabelle 6 und Abbildung 2.

5. Versuchsreihe

Gleiche Methodik. Die Hyaluronidasehemmung wurde hier 45 und 60 Minuten nach Gabe von Dimethylaminoäthanolglutamat 0,5 mg/100 g Tier i.v. bei adrenalectomierten Tieren geprüft. Die Ergebnisse zeigen Tabelle 7 und Abbildung 3.

6. Versuchsreihe

Diesmal wurde nach gleicher Methode die Hyaluronidasehemmung an intacten Tieren nach i.v. Gabe von 0,5 mg Dimethylaminoäthanolglutamat wiederum 45 und 60 Minuten nach der i.v. Applikation ausgewertet. Diese Ergebnisse zeigen Tabelle 8 und Abb. 4.

Adrenalektomierte Tiere

Acetylcholin 0,2 mg/100 g und Prostigmin 1 γ /100 g

Tier Nr	Farbstoff-Quaddel		Farbstoff-Hyaluronidase- Quaddel				
	vor	0' nach	vor	0' nach	15' Injektionsbeginn	45'	60'
22	132	110	211	210	205	183	202
21	120	130	184	186	170	200	186
23	109	105	199	177	195	186	195
19	98	128	216	211	225	200	229
Hemmung				7.4	4.3	11.7	-0.5%

- Tabelle 1 -
(nach Schlierf)

Adrenalektomierte Tiere

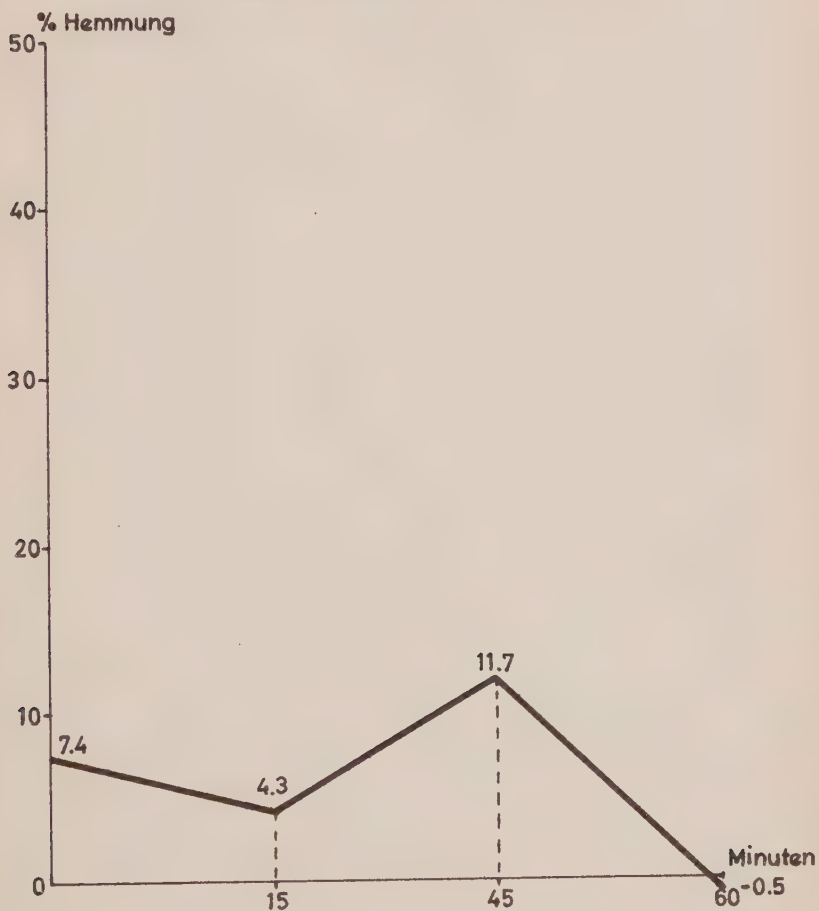
Acetylcholin 0,2 mg/100 g und Prostigmin 1 γ /100 g
Statistische Auswertung

	Farbstoff-Quaddel		Farbstoff-Hyaluronidase- Quaddel				
	vor	0' nach	vor	0' nach	15' Injektionsbeginn	45'	60'
$\bar{x}$	115	118	202	196	199	192	203 mm ²
s ²	213	159	203	294	523	82	343
s	14.6	12.6	14.2	17.1	22.9	9.1	18.5
Hemmung				7.4	4.3	11.7	-0.5%
Signifikanz				-	-	-	-
P				-	-	-	-
Tierzahl N = 4							

- Tabelle 2 -
(nach Schlierf)

Adrenalektomierte Tiere

0,2 mg Acetylcholin + 1% Prostigmin i.v./100 g Tier
(nach Schlierf)



- Abbildung 1 -

Tier Nr	Farb- stoff- quaddel	Hy'ase- quaddel	Farb- stoff- quaddel	Hy'ase- quaddel	Farb- stoff- quaddel	Hy'ase- quaddel
	<u>Vor Acetylcholin</u> <u>+ Prostigmin</u> <u>i.v.</u>		<u>zugleich mit</u> <u>Acetylcholin</u> <u>+Prostigmin i.v.</u>		<u>45 Minuten nach</u> <u>Acetylcholin</u> <u>+Prostigmin i.v.</u>	
1	119	193	120	183	110	140
2	124	200	120	180	100	139
3	122	216	118	200	116	149
4	108	213	110	201	104	157
5	114	218	113	102	110	160
6	105	218	105	189	103	142
7	100	192	98	179	102	138
8	109	209	112	198	110	144
9	104	210	102	191	105	157
10	110	199	108	182	110	144
11	102	207	106	193	104	151
12	100	198	97	183	99	150
13	108	213	110	200	110	142
14	112	210	120	198	116	138
15	102	199	98	188	100	143

Tier Nr	Farb- stoff- quaddel	Hy'ase- quaddel	Farb- stoff- quaddel	Hy'ase quaddel	Farb- stoff- quaddel	Hy'ase quaddel
	<u>Vor Acetylcholin</u> <u>+ Prostigmin</u> <u>i.v.</u>		<u>15 Minuten nach</u> <u>Acetylcholin</u> <u>+Prostigmin i.v.</u>		<u>60 Minuten nach</u> <u>Acetylcholin</u> <u>+Prostigmin i.v.</u>	
1	120	210	115	180	110	132
2	104	198	102	158	100	141
3	125	200	122	167	118	138
4	110	204	100	157	102	129
5	98	195	93	154	100	118
6	113	212	105	175	98	134
7	115	210	120	174	120	148
8	110	198	104	167	107	126
9	112	208	101	168	97	131
10	118	214	110	172	106	140
11	102	219	98	172	100	131
12	114	213	100	180	95	138
13	110	208	106	168	100	132
14	104	209	100	176	95	129
15	98	210	102	173	99	130

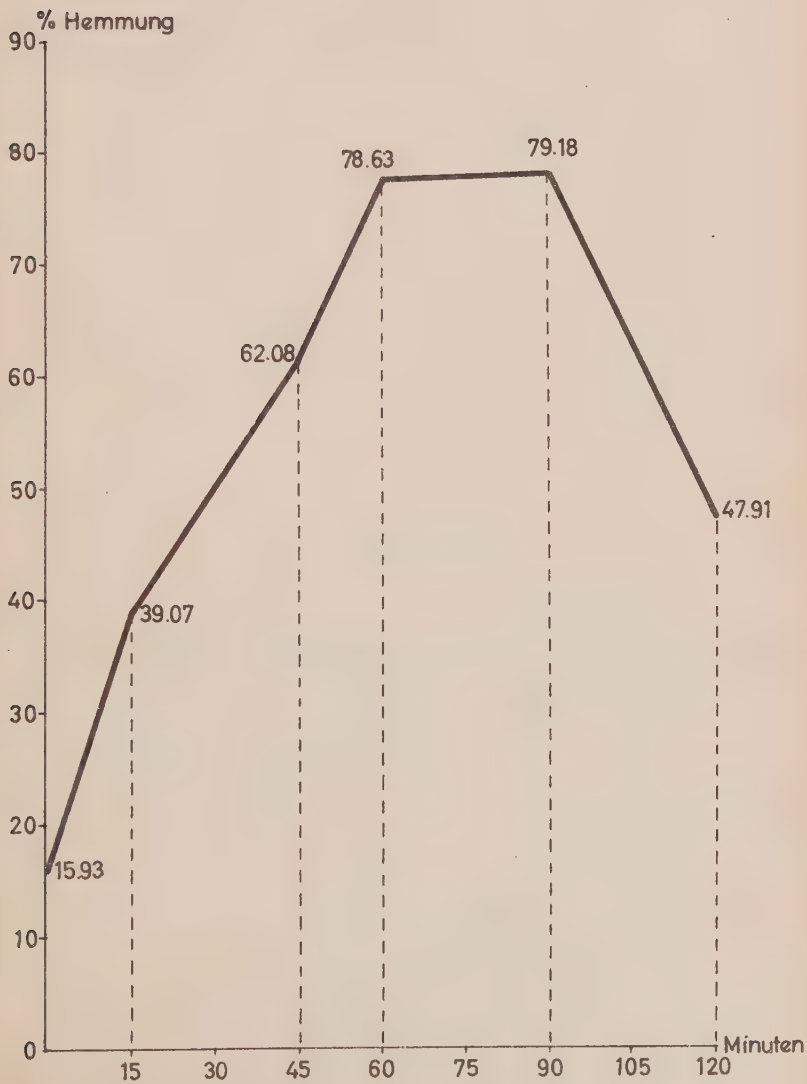
Tier Nr	Farb- stoff- quaddel	Hy'ase quaddel	Farb- stoff- quaddel	Hy'ase quaddel	Farb- stoff- quaddel	Hy'ase quaddel
	<u>Vor Acetylcholin</u> + Prostigmin i.v.		<u>45 Minuten nach</u> <u>Acetylcholin</u> +Prostigmin i.v.		<u>60 Minuten nach</u> <u>Acetylcholin</u> +Prostigmin i.v.	
1	120	210	110	150	98	129
2	108	204	116	145	110	134
3	114	192	109	160	97	126
4	116	218	103	157	107	131
5	109	213	110	146	100	128
6	124	216	108	152	120	149

- Tabelle 5 -

Tier Nr	Farb- stoff- quaddel	Hy'ase quaddel	Farb- stoff- quaddel	Hy'ase quaddel	Farb- stoff- quaddel	Hy'ase quaddel
	<u>Vor Acetylcholin</u> + Prostigmin i.v.		<u>90 Minuten nach</u> <u>Acetylcholin</u> +Prostigmin i.v.		<u>120 Minuten nach</u> <u>Acetylcholin</u> +Prostigmin i.v.	
1	109	208	104	133	110	155
2	122	215	107	119	120	174
3	114	202	112	120	123	160
4	119	210	115	126	118	164
5	111	204	108	129	121	159
6	118	213	112	118	125	172

- Tabelle 6 -

0,2 mg Acetylcholin + 1% Prostigmin i.v./100 g Tier



Adrenalektomierte Tiere

Dimethylaminoäthanolglutamat 0,5 mg/100 g Ratte

Tier Nr	Farb- stoff- quaddel	Hy'ase quaddel	Farb- stoff- quaddel	Hy'ase quaddel	Farb- stoff- quaddel	Hy'ase quaddel
	Probequaddel		<u>45 Minuten nach</u> Dimethylamino- äthanolglutamat i.v.		<u>60 Minuten nach</u> Dimethylamino- äthanolglutamat i.v.	
1	114	203	119	210	116	206
2	108	197	124	201	120	203
3	123	211	110	204	108	208
4	116	200	121	198	117	209
5	124	223	131	215	130	220
6	109	202	117	208	119	210

- Tabelle 7 -

Intakte Tiere

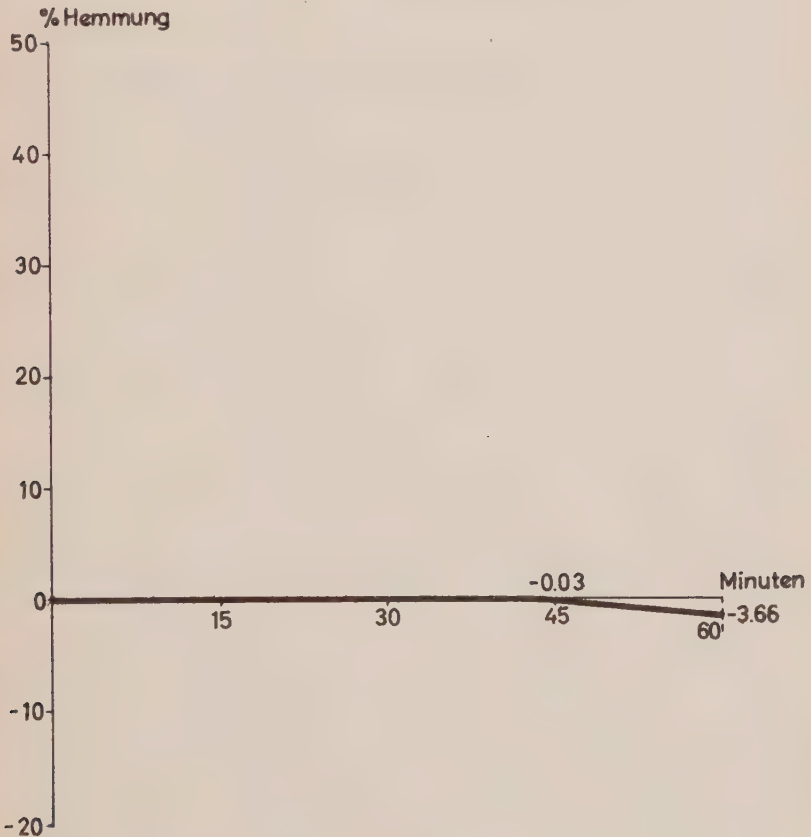
Dimethylaminoäthanolglutamat 0,5 mg/100 g Ratte

Tier Nr	Farb- stoff- quaddel	Hy'ase quaddel	Farb- stoff- quaddel	Hy'ase quaddel	Farb- stoff- quaddel	Hy'ase quaddel
	Probequaddel		<u>45 Minuten nach</u> Dimethylamino- äthanolglutamat i.v.		<u>60 Minuten nach</u> Dimethylamino- äthanolglutamat i.v.	
1	120	176	106	139	100	120
2	115	201	110	145	107	100
3	113	190	117	140	110	117
4	118	204	108	142	102	115
5	122	198	112	146	110	104
6	109	195	106	138	106	111

- Tabelle 8 -

Adrenalektomierte Tiere

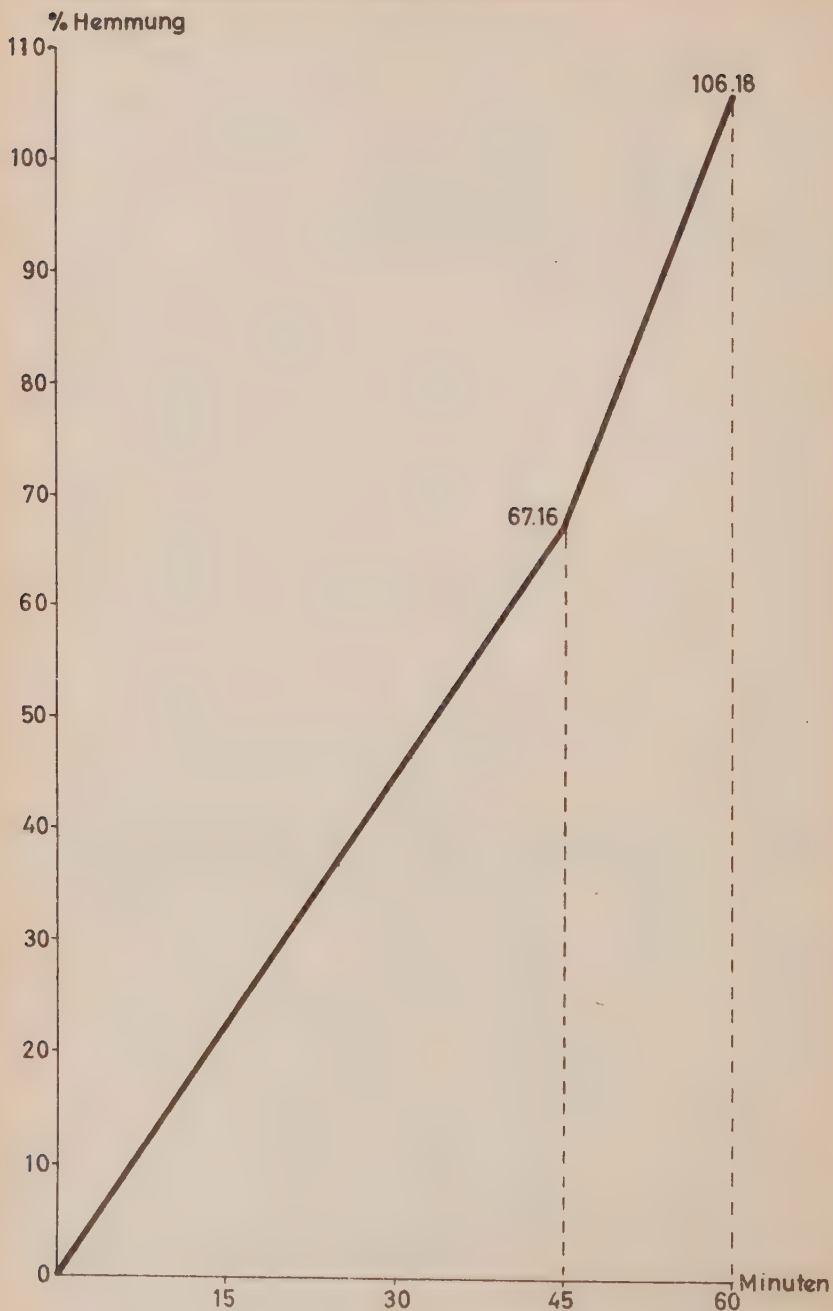
Dimethylaminoäthanol 0,5 mg/100 g Ratte, i.v.



- Abbildung 3 -

Intakte Tiere

Dimethylaminoäthanol 0,5 mg/100 g Ratte, i.v.



- Abbildung 4 -

Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse

Die Versuche, die nachstehend statistisch ausgewertet werden, dienten der Untersuchung des Mechanismus der Hyaluronidasehemmung, der durch i.v. Applikation einer Kombination von Acetylcholin und Prostigmin sowie durch i.v. Applikation von Dimethylaminoäthanolglutamat ausgelöst wird. Als Versuchstiere wurden Ratten verwendet.

Zur Bestimmung der Hyaluronidasehemmung diente ein Spreading-Test, wie er bereits bei anderen Versuchen mit analoger Fragestellung zur Anwendung gelangte. Hierbei wurden jeweils zum gleichen Zeitpunkt je eine reine Farbstoffquaddel und eine Farbstoff+Hyaluronidasequaddel gesetzt, deren Fläche, 10 Minuten nach dem Setzen, als Mass für die Diffusionsgeschwindigkeit des reinen Farbstoffs bzw. des Farbstoff+Hyaluronidasegemisches angesehen wurde. Die angegebenen Masszahlen sind somit die Flächen der Quaddeln, ausgedrückt in mm^2 .

Bei jedem Versuchstier wurde, vor Beginn der eigentlichen Versuche, zunächst die Ausbreitung je einer reinen Farbstoffquaddel und einer Farbstoff+Hyaluronidasequaddel bestimmt (Bestimmung des Ausgangswertes). Nach Applikation der Prüfsubstanzen wurde, zu vorher festgesetzten Zeitpunkten, wiederum gleichzeitig je eine Farbstoffquaddel und eine Farbstoff+Hyaluronidasequaddel gesetzt. Wegen der beschränkten Grösse der Bauchhaut der Ratten können bei einem Versuchstier maximal 6 Quaddeln gesetzt werden. Es konnte daher bei einem einzelnen Versuchstier nur zu zwei verschiedenen Zeiten p.i. die Diffusionsgeschwindigkeit der Quaddeln bestimmt werden. Um den Mechanismus der Hyaluronidasehemmung über einen längeren Zeitraum p.i. verfolgen zu können, war es daher notwendig, einen Versuch in mehrere Teilversuche zu gliedern, wobei innerhalb dieses Teilver-

suches die Hyaluronidasehemmung zu zwei Zeitpunkten p.i. bestimmt wurde. Im einzelnen wurden die folgenden Versuche mit der angegebenen Gliederung in Teilversuchen durchgeführt:

Versuchsreihe 1. Bestimmung der Hyaluronidasehemmung bei normalen Ratten nach i.v. Applikation von Acetylcholin + Prostigmin

- 1a) Hyaluronidasehemmung 5' und 45' p.i.;
- 1b) Hyaluronidasehemmung 15' und 60' p.i.;
- 1c) Hyaluronidasehemmung 45' und 60' p.i.;
- 1d) Hyaluronidasehemmung 90' und 120' p.i.

Versuchsreihe 2. Bestimmung der Hyaluronidasehemmung bei normalen Ratten nach i.v. Applikation von Dimethylamino-äthanolglutamat 45' und 60' p.i.

Versuchsreihe 3. Bestimmung der Hyaluronidasehemmung bei adrenalectomierten Ratten nach i.v. Applikation von Dimethylaminoäthanolglutamat 45' und 60' p.i.

I. Methodik der statistischen Auswertung und statistisches Modell

Bei der statistischen Interpretation und Auswertung der Versuchsergebnisse waren folgende Faktoren zu berücksichtigen, die einen wesentlichen Einfluss auf die Diffusionsgeschwindigkeit sowohl der reinen Farbstoff- als auch der Farbstoff+Hyaluronidasequaddeln eines Versuchstieres ausüben:

- a) Individuelle Ausgangslage des Versuchstieres;
- b) Zeitpunkt innerhalb des Versuches, zu dem die Quaddeln gesetzt wurden.

Zu diesen systematischen Faktoren treten noch zufällige Faktoren hinzu, insbesondere ist hier der reine experimentelle Fehler zu berücksichtigen.

Als Mass für die Wirkung der Medikation auf die Ausbreitung der Quaddeln ist der Unterschied in der Fläche der Quaddeln zu den Zeitpunkten p.i. gegenüber ihrem Ausgangswert bei jedem Versuchstier anzusehen. Dieses Mass kann sinnvollerweise jedoch nur dann zu allgemeinen Schlüssen verwendet werden, wenn die Grösse dieses Unterschiedes weitgehend von dem individuellen Versuchstier unabhängig ist. Ob dies zutrifft, lässt sich in völlig eindeutiger Weise nur dann klären, wenn für jeden Zeitpunkt und jeden Quaddeltypus Doppelbestimmungen vorliegen. Aus versuchstechnischen Gründen (die Grösse der Bauchhaut der Ratten lässt maximal nur das Setzen von 6 Quaddeln zu) lassen sich Doppelbestimmungen nur bei Langzeitversuchen über mehrere Wochen hinweg durchführen. In einer anderen Arbeit (H a u p t) konnte jedoch bei Langzeitversuchen gezeigt werden, dass der Unterschied in der Fläche der Quaddeln gegenüber ihrem Ausgangswert eine Grösse ist, die weitgehend von dem individuellen Versuchstier unabhängig ist.

Die vorstehenden Versuche bieten allerdings ebenfalls eine Möglichkeit, wenigstens annähernd zu prüfen, ob die Änderungen der Quaddelflächen von den Versuchstieren unabhängig sind. Diese Prüfung ergibt sich aus den folgenden Überlegungen. Die Unterschiede zwischen den Ausgangswerten der verschiedenen Tiere sind ein Ausdruck der biologischen Variabilität zwischen den verschiedenen Versuchstieren. Ein Mass für diese biologische Variabilität ist die Varianz s^2 zwischen den Ausgangswerten der Versuchstiere einer Versuchsreihe. Trifft die Annahme zu, dass die Änderungen der Quaddelflächen p.i.

gegenüber dem Ausgangswert eine von den Versuchstieren unabhängige Grösse ist, so muss die Varianz zwischen den Messwerten zum gleichen Zeitpunkt p.i. von der gleichen Grössenordnung sein wie die Varianz der Ausgangswerte. Statistisch ausgedrückt bedeutet dies, dass die Varianzen zwischen den Messwerten der Versuchstiere einer Versuchsreihe zu den verschiedenen Zeitpunkten alle Schätzwerte der gleichen, übergeordneten Varianz s^2 sind. Ob dies zutrifft, lässt sich mittels des BARTLETT-Tests prüfen.

Berechnet man für jeden Zeitpunkt einer Teilversuchsreihe die Mittelwerte aus den an den verschiedenen Versuchstieren gemessenen Flächen der beiden Quaddeltypen, so ist der Unterschied zwischen den Mittelwerten, die zu Zeitpunkten p.i. gehören, gegenüber dem Mittelwert, der zu den Ausgangswerten gehört, die beste statistische Schätzung für die Änderung der Quaddelflächen, die durch die Medikation bedingt werden (dies gilt unter der oben gemachten Voraussetzung, dass diese Änderungen im wesentlichen von dem individuellen Versuchstier unabhängig sind). Für die Interpretation der Versuchsergebnisse kommt somit dem absoluten Wert dieser Mittelwerte keinerlei Bedeutung zu, wesentlich ist lediglich die Differenz zwischen den Mittelwerten vor und nach Applikation der Prüfsubstanzen. Die tatsächliche Grösse der Mittelwerte ist wesentlich abhängig von der individuellen Ausgangslage der Versuchstiere, die in der betreffenden Versuchsreihe herangezogen wurden.

Die Aufgabe der statistischen Auswertung der Versuchsergebnisse war es nunmehr für jede Teilversuchsreihe in erster Linie zu prüfen, für welche Zeitpunkte p.i. ein gesicherter Mittelwertsunterschied gegenüber dem Ausgangswert vorliegt. Bei der Untersuchung

dieser Frage waren die oben angeführten beiden Faktoren a) und b) zu berücksichtigen, so dass die statistische Analyse mittels einer Varianz-Analyse durchgeführt werden musste, welche die Unterschiede zwischen den Tieren und zwischen den verschiedenen Zeitpunkten berücksichtigt. Es war ausserdem notwendig, die Varianz-Analysen getrennt für die reine Farbstoffquaddel und für die Farbstoff+Hyaluronidasequaddel durchzuführen, da das Verhalten dieser beiden Quaddeltypen nicht als vollkommen gleichartig angesehen werden kann.

Grundlage der zweifachen Varianz-Analyse ist die bereits oben diskutierte Hypothese, dass die Unterschiede zwischen den Quaddelgrössen eines Versuchstieres von einem Zeitpunkt zum anderen eine von dem Versuchstier im wesentlichen unabhängige Grösse besitzen. Sieht man diese Hypothese als eine ausreichende Näherung an den realen Sachverhalt an, so liefert die Varianz-Analyse in Form der Rest-Varianz ein Mass für die Abweichung der tatsächlich gemessenen Werte von den aufgrund der Hypothese zu erwartenden Werten. Als Ursache dieser Abweichungen sind zufällige Faktoren anzusehen, beispielsweise eine gewisse biologische Variabilität in der Reaktion der Tiere auf die Medikation, ausserdem ist in der Rest-Varianz auch noch der reine experimentelle Fehler enthalten. Ohne Doppelbestimmungen ist jedoch die Elimination des experimentellen Fehlers aus der Rest-Varianz statistisch nicht möglich, es war daher notwendig, die gesamte Rest-Varianz als eine Schätzung des Versuchsfehlers anzusehen. Sie wurde daher von uns bei den statistischen Prüfungen als Versuchsfehler zugrunde gelegt.

Ein gesicherter Mittelwertsunterschied zwischen den verschiedenen Quaddelflächen zu den verschiedenen Zeitpunkten einer Teilver-

suchsreihe liegt nur dann vor, wenn die zur Varianz zwischen den Zeiten gehörige Varianz-Komponente in der zugehörigen Varianz-Analyse statistisch gesichert grösser ist als die zugehörige Rest-Varianz. Ob dies zutrifft, wird mittels des Varianz-Quotienten $F_{\text{emp.}}$ geprüft, der in den jeweiligen Varianz-Analysen angegeben ist. Ist die Überschreitungswahrscheinlichkeit dieses Varianz-Quotienten $F_{\text{emp.}}$ in der zugehörigen F-Prüfverteilung kleiner als 1% bzw. kleiner als 0.1%, so liegen statistisch gesicherte bzw. hoch gesicherte Mittelwertsunterschiede zwischen den verschiedenen Zeitpunkten einer Teilversuchsreihe vor. Die Varianz-Analyse gibt jedoch keinen Aufschluss darüber, ob zu einem bestimmten Zeitpunkt p.i. speziell ein gesicherter Mittelwertsunterschied gegenüber dem Ausgangswert vorliegt. Hierzu war im Anschluss an die Varianz-Analysen eine weitere Prüfung notwendig, die mittels eines von DUNCAN entwickelten Tests durchgeführt wurde. Dieser Test dient speziell dazu, im Anschluss an die Varianz-Analysen mehrere Mittelwertsdifferenzen simultan zu prüfen. (Da die für diesen Test notwendigen Tabellen nur für Irrtumswahrscheinlichkeiten von 5% und 1% vorliegen, lassen sich mittels des DUNCAN-Tests nur solche Entscheidungen treffen, deren Irrtumswahrscheinlichkeiten höchstens 5% bzw. 1% sind.) Als Versuchsfehler, d.h. als Fehler-Varianz gelangt beim DUNCAN-Test ebenfalls die Rest-Varianz der zugehörigen Varianz-Analyse zur Anwendung. Liefert der DUNCAN-Test für einen Zeitpunkt p.i. auf dem 5% bzw. auf dem 1%-Niveau einen gesicherten Mittelwertsunterschied gegenüber dem Ausgangswert, so kann mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von höchstens 5% bzw. von höchstens 1% behauptet werden, dass durch die Medikation eine Änderung in der Diffusionsgeschwindigkeit des entsprechenden Quaddeltypus zu dem entsprechenden Zeitpunkt des Ver-

suches hervorgerufen wurde. Darüber, ob es sich bei dieser Änderung um eine Vergrößerung bzw. Verkleinerung handelt, gibt die zugehörige Mittelwertsdifferenz Auskunft.

II. Ergebnisse der statistischen Auswertung der Versuche.

Es sei zunächst auf die Ergebnisse der Varianz-Analysen eingegangen, die sich in den Tabellen I - III befinden. In diesen Tabellen bedeutet in den Schematas der Varianz-Analysen jeweils SAQ das Summen-Abstands-Quadrat, MAQ das Mittlere-Abstands-Quadrat und n die Zahl der Freiheitsgrade, die den jeweiligen Varianzkomponenten zukommen. $F_{\text{emp.}}$ ist der Varianz-Quotient der jeweiligen Varianz-Komponente gegenüber der Rest-Varianz. p ist die Überschreitungswahrscheinlichkeit, die diesem Varianz-Quotient in der zugehörigen F-Prüfverteilung zukommt. Im einzelnen sind die Ergebnisse der Varianz-Analysen wie folgt zu interpretieren.

Reine Farbstoffquaddeln. Für einen Teil der Versuchsreihen ist die zur Varianz zwischen den Zeiten gehörige Varianzkomponente der reinen Farbstoffquaddeln gesichert grösser als die zugehörige Rest-Varianz (1b, 1d und 2). Bei diesen Versuchsreihen liegen somit gesicherte Unterschiede in den Flächen der reinen Farbstoffquaddeln zu den verschiedenen Zeitpunkten der Teilversuchsreihen vor. Besonders sei darauf hingewiesen, dass die zur Varianz zwischen den Tieren gehörige Varianz-Komponente bei einem Teil der Versuchsreihen ebenfalls gesichert grösser ist als die Rest-Varianz (1a, 1b und 1d). Dies bedeutet, dass es nicht sinnvoll wäre, die biologische Variabilität zwischen den Tieren nicht zu berücksichtigen. Insbesondere ergibt sich

hieraus, dass die Varianz s^2 zwischen den Messwerten der verschiedenen Tiere einer Versuchsreihe keinen Aufschluss über den tatsächlichen Versuchsfehler, d.h. über die biologische Variabilität in der Reaktion der Tiere auf die Medikation und den experimentellen Fehler, liefert. Sie stellt lediglich den statistischen Ausdruck für die biologische Tatsache dar, dass die verschiedenen Versuchstiere auf verschiedenem Niveau reagieren, was möglicherweise auf den unterschiedlichen natürlichen Hyaluronidasegehalt ihrer Epidermis zurückzuführen ist. Es wäre völlig falsch, aus der Grösse dieser Varianz s^2 irgendwelche Schlüsse auf die Genauigkeit der Methode ziehen zu wollen.

Farbstoff+Hyaluronidasequaddel. Bei allen Versuchsreihen bzw. Teilversuchsreihen, mit Ausnahme der Versuchsreihe 3, ist die zur Varianz zwischen den Zeiten gehörige Varianz-Komponente gesichert grösser als die Rest-Varianz. Bei allen diesen Versuchsreihen liegen somit statistisch gesicherte Unterschiede zwischen den zu den verschiedenen Zeitpunkten einer Versuchsreihe gehörigen Mittelwerten vor. Bei der Versuchsreihe 3 dagegen liegen statistisch keinerlei Anhaltspunkte dafür vor, dass durch die Medikation die Ausbreitung der Farbstoff+Hyaluronidasequaddel in irgendeiner Weise beeinflusst worden ist. Eine weitere Analyse dieser Versuchsreihe erübrigt sich damit.

Auch bei der Farbstoff+Hyaluronidasequaddel muss darauf hingewiesen werden, dass bei einem Teil der Versuchsreihen die zur Varianz zwischen den Tieren gehörige Varianz-Komponente gesichert grösser ist als die Rest-Varianz. Die Interpretation dieses Ergebnisses ist vollkommen analog derjenigen, die bereits oben für die reine Farbstoffquaddel gegeben wurde.

Da den Varianz-Analysen das bereits oben mehrfach erwähnte statistische Modell zugrunde liegt, dass die Unterschiede zwischen den Quaddelflächen von einem Zeitpunkt des Versuches zum anderen im wesentlichen von den Versuchstieren unabhängig ist, erhalten die Ergebnisse der Varianz-Analysen ihre volle Bedeutung erst im Zusammenhang mit den Ergebnissen des BARTLETT-Tests. Der BARTLETT-Test prüft, ob die Varianzen s^2 (s. die Tabellen 1 - 3) der gleichen Versuchsreihe untereinander homogen sind. Das Ergebnis des BARTLETT-Tests ist am Fusse jeder Varianz-Analyse angegeben. Es bedeutet hierin χ^2_{emp} die beim BARTLETT-Test berechnete Prüfgrösse, die einer Chi-Quadrat-Verteilung der unter n angegebenen Zahl von Freiheitsgraden genügt. p ist die Überschreitungswahrscheinlichkeit, die dieser Prüfgrösse in der angegebenen Prüfverteilung höchstens zukommt. Solange diese Überschreitungswahrscheinlichkeit nicht kleiner als 5% ist, liegen statistisch keinerlei Hinweise dafür vor, dass die geprüften Varianzen untereinander nicht homogen seien. Bei keiner der vorliegenden Versuchsreihen ist diese Überschreitungswahrscheinlichkeit kleiner als 5%, die Varianzen s^2 können somit als homogen angesehen werden. Aufgrund der oben (unter I) angegebenen Interpretation des BARTLETT-Tests darf daher als 1. Näherung gesichert gelten, dass unser statistisches Modell den realen Sachverhalt mit ausreichender Genauigkeit wiedergibt. Es ist somit berechtigt, die Mittelwerts-Differenz zwischen einem Zeitpunkt p.i. und dem Ausgangswert als ein absolutes Mass für die Änderung der Fläche einer Farbstoffquaddel bzw. einer Farbstoff+Hyaluronidasequaddel aufgrund der Medikation anzusehen. Dass diese Erwägungen nicht nur rein theoretischer Natur sind, sondern einen tatsächlichen Sachverhalt wiedergeben, wird weiter unten noch gezeigt werden.

Abschliessend ist noch das Ergebnis des DUNCAN-Tests zu besprechen. In den Tabellen 1 - 3 findet sich für jede Teilversuchsreihe für jeden Zeitpunkt zunächst der Mittelwert $\bar{x}$ aus den zu diesem Zeitpunkt bestimmten Messwerten aller Versuchstiere, ausserdem die Varianz s^2 zwischen den Messwerten dieser Versuchstiere. Auf die Bedeutung dieser Varianz wurde oben bereits mehrfach eingegangen. In der mit $\bar{x}_t - \bar{x}_0$ überschriebenen Spalte ist die Mittelwerts-Differenz zu jedem Zeitpunkt gegenüber dem Ausgangswert angegeben. Diese Mittelwerts-Differenz ist, wie bereits oben erwähnt, das absolute Mass für die Änderung der Quadelflächen zu den Zeitpunkten p.i. gegenüber den Ausgangswerten anzusehen. Besonders sei auf die Teilversuchsreihen 1a, 1b und 1c hingewiesen. In den Teilversuchsreihen 1a und 1c ist an jeweils zwei verschiedenen, voneinander unabhängigen Tiergruppen die Hyaluronidasehemmung zu dem Zeitpunkt 45' p.i. bestimmt worden. Bei der Teilversuchsreihe 1a ergab sich dabei zum Zeitpunkt 45' p.i. eine Verkleinerung der Fläche der Farbstoff+Hyaluronidasequaddel um 60 mm^2 , bei der Versuchsreihe 1c eine Verkleinerung um 58 mm^2 . Analog wurde bei den beiden Teilversuchsreihen 1b und 1c an zwei, voneinander unabhängigen Tiergruppen die Hyaluronidasehemmung zum Zeitpunkt 60' p.i. bestimmt. Bei der Versuchsreihe 1b ergab sich dabei eine Verkleinerung der Fläche der Farbstoff+Hyaluronidasequaddel um 74 mm^2 , bei der Versuchsreihe 1c um 76 mm^2 . Abgesehen von allen obigen statistischen Erörterungen kann dies als ein experimenteller Beweis dafür angesehen werden, eine exakte und saubere Versuchsdurchführung vorausgesetzt, dass tatsächlich die Mittelwerts-Unterschiede ein angemessenes Mass für die Änderungen der Farbstoff bzw. der Farbstoff+Hyaluronidasequaddeln darstellt. Es muss dabei darauf hingewiesen

werden, dass die für die Farbstoff+Hyaluronidasequaddel hervorgehobenen Tatsachen auch für die reine Farbstoffquaddel zutreffen, wie sich unmittelbar aus den Tabellen ergibt.

Die Tabellen 1 - 3 enthalten schliesslich noch das Ergebnis des DUNCAN-Tests in der Form, dass in der Spalte "Sicherung" die Irrtumswahrscheinlichkeit angegeben ist, mit der ein gesicherter Mittelwerts-Unterschied gegenüber dem Ausgangswert behauptet werden kann. Diese Irrtumswahrscheinlichkeit wurde angegeben soweit sie kleiner als 5% bzw. kleiner als 1% ist, da nur in diesen Fällen eine schwache bzw. eine ausreichende statistische Sicherung für diese Aussage vorliegt.

Schliesslich enthalten diese Tabellen noch die prozentuale Hyaluronidasehemmung, die in der gleichen Weise berechnet wurde wie es schon in anderen Arbeiten geschehen ist. Der prozentualen Hyaluronidasehemmung ist jedoch mehr ein suggestiver als ein objektiver Wert zuzumessen. Wesentlich für die Interpretation der Versuche ist lediglich die Mittelwerts-Differenz.

V E R S U C H S R E I H E Ia

Farbstoffquaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen Tieren	14	1.784	127	8.47	0.1 %
Zwischen Zeiten	2	68	34	2.27	-
Rest - Varianz	28	408	15		
Gesamt - Varianz	44	2.260	51		

$$n = 2; \chi^2_{\text{emp.}} = 1.925; p = 30\%$$

Farbstoff+ Hyaluronidasequaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen Tieren	14	2.090	149	5.73	0.1 %
Zwischen Zeiten	2	29.260	14.630	100.00	0.1 %
Rest - Varianz	28	720	26		
Gesamt - Varianz	44	32.070	729		

$$n = 2; \chi^2_{\text{emp.}} = 0.741; p = 50\%$$

T a b e l l e Ia

V E R S U C H S R E I H E Ib

Farbstoffquaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen Tieren	14	2.225	159	10°60	0°1 %
Zwischen Zeiten	2	396	198	13°20	0°1 %
Rest - Varianz	28	414	15		
Gesamt - Varianz	44	3.035	69		

$$n = 2; \chi^2_{\text{emp.}} = 0°281; p = 80\%$$

Farbstoff+Hyaluronidasequaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen Tieren	14	1.477	105	3°89	0°1 %
Zwischen Zeiten	2	41.150	20.575	100°00	0°1 %
Rest - Varianz	28	770	27		
Gesamt - Varianz	44	43.397	986		

$$n = 2; \chi^2_{\text{emp.}} = 0°886; p = 50\%$$

T a b e l l e Ib

V E R S U C H S R E I H E I c

Farbstoffquaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen Tieren	5	247	49	1°14	-
Zwischen Zeiten	2	293	146	3°39	-
Rest - Varianz	10	425	43		
Gesamt - Varianz	17	965	57		
n = 2; $\chi^2_{\text{emp.}} = 2°832$; p = 20%					

Farbstoff+Hyaluronidasequaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen Tieren	5	374	75	1°21	-
Zwischen Zeiten	2	18.797	9.398	100°00	0°1 %
Rest - Varianz	10	615	62		
Gesamt - Varianz	17	19.786	1.164		
n = 2; $\chi^2_{\text{emp.}} = 1°216$; p = 50%					

T a b e l l e I c

V E R S U C H S R E I H E Id

Farbstoffquaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen Tieren	5	230	46	3·83	5·0 %
Zwischen Zeiten	2	293	146	12·17	1·0 %
Rest - Varianz	10	115	12		
Gesamt - Varianz	17	638	38		

$$n = 2; \chi^2_{\text{emp.}} = 0·596; p = 70\%$$

Farbstoff+Hyaluronidasequaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen Tieren	5	139	28	-	
Zwischen Zeiten	2	21.444	10.722	100·00	0·1 %
Rest - Varianz	10	461	46		
Gesamt - Varianz	17	22.044	1.297		

$$n = 2; \chi^2_{\text{emp.}} = 0·969; p = 50\%$$

T a b e l l e Id

V E R S U C H S R E I H E II

Farbstoffquaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen Tieren	5	127	25	1·56	-
Zwischen Zeiten	2	326	163	10·19	1·0 %
Rest - Varianz	10	161	16		
Gesamt - Varianz	17	614	36		

$$n = 2; \chi^2_{\text{emp.}} = 0·106; p = 95\%$$

Farbstoff+Hyaluronidasequaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen Tieren	5	117	23	-	
Zwischen Zeiten	2	21.061	10.530	100·00	0·1 %
Rest - Varianz	10	745	74		
Gesamt - Varianz	17	21.923	1.290		

$$n = 2; \chi^2_{\text{emp.}} = 5·0261; p = 05 \%$$

T a b e l l e II

VERSUCHSREIHE III

Farbstoffquaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen Tieren	5	413	83	2·59	-
Zwischen Zeiten	2	66	33	1·03	-
Rest - Varianz	10	317	32		
Gesamt - Varianz	17	796	47		

$$n = 2; \chi^2_{\text{emp.}} = 0·116; p = 90\%$$

Farbstoff+Hyaluronidasequaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen Tieren	5	658	132	8·25	1·0 %
Zwischen Zeiten	2	44	22	1·37	-
Rest - Varianz	10	160	16		
Gesamt - Varianz	17	862	51		

$$n = 2; \chi^2_{\text{emp.}} = 1·480; p = 30\%$$

Tabelle III

V E R S U C H S R E I H E 1a

	$\bar{x}$	s^2	$\bar{x}_t - \bar{x}_0$	Hemmung	Sicherung
E_v	109	59			
H_v	206	78			
$E_{5'}$	109	67	0		
$H_{5'}$	191	69	- 15	15°51 %	1 %
$E_{45'}$	107	31	- 2		
$H_{45'}$	146	53	- 60	61°29 %	1%

T a b e l l e 1a

V E R S U C H S R E I H E 1b

	$\bar{x}$	s^2	$\bar{x}_t - \bar{x}_0$	Hemmung	Sicherung
E_v	110	62			
H_v	207	46			
$E_{15'}$	105	67	- 5		
$H_{15'}$	169	63	- 38	36°9 %	1 %
$E_{60'}$	103	59	- 7		
$H_{60'}$	133	51	- 74	73°3 %	1 %

T a b e l l e 1b

VERSUCHSREIHE 1c

	$\bar{x}$	s^2	$\bar{x}_t - \bar{x}_0$	Hemmung	Sicherung
E_v	115	39			
H_v	209	92			
$E_{45'}$	109	17	- 6		
$H_{45'}$	151	35	- 58	57° 8 %	1 %
$E_{60'}$	105	78	- 10		
$H_{60'}$	133	70	- 76	76° 9 %	1 %

Tabelle 1c

VERSUCHSREIHE 1d

	$\bar{x}$	s^2	$\bar{x}_t - \bar{x}_0$	Hemmung	Sicherung
E_v	115	25			
H_v	208	25			
$E_{90'}$	109	16	- 6		5 %
$H_{90'}$	124	37	- 84	90° 0 %	1 %
$E_{120'}$	119	27	+ 4		
$H_{120'}$	164	57	- 44	47° 6 %	1 %

Tabelle 1d

VERSUCHSREIHE 2

	$\bar{x}$	s^2	$\bar{x}_t - \bar{x}_o$	Hemmung	Sicherung
E_v	116	23			
H_v	194	101			
$E_{45'}$	110	18	- 6		5 %
$H_{45'}$	141	11	- 53	62°8 %	1 %
$E_{60'}$	106	17	- 10		1 %
$H_{60'}$	111	61	- 83	99°4 %	1 %

Tabelle 2

VERSUCHSREIHE 3

	$\bar{x}$	s^2	$\bar{x}_t - \bar{x}_o$	Hemmung	Sicherung
E_v	115	46			
H_v	206	91			
$E_{45'}$	120	49	+ 5		
$H_{45'}$	206	39	0	- 3°8 %	-
$E_{60'}$	118	51	+ 3		
$H_{60'}$	209	33	+ 3	- 3°8 %	-

Tabelle 3

Diskussion

Im Gegensatz zu den von S c h l i e r f ⁸ erhobenen Befunden, nach denen Acetylcholin+Prostigmin bei adrenaletomierten Ratten zu keiner Hyaluronidasehemmung führt, konnte festgestellt werden, dass bei intakten Ratten eine Hyaluronidasehemmung auftritt. Diese Ergebnisse finden ihre Parallele in der Arbeit von M a r - q u a r d t und Mitarbeitern ²³, in der eine antiphlogistische Wirkung von Acetylcholin festgestellt werden konnte. Auf gewisse Zusammenhänge zwischen antiphlogistischer und hyaluronidasehemmender Wirkung wurde eingangs bereits hingewiesen. Die Versuchsergebnisse von S c h l i e r f ⁸ haben gezeigt, dass mit einer primären Einstellung einer vagalen Phase keine Hyaluronidasehemmung zu erzielen ist, sondern dass vielmehr im Anschluss an eine sympatiktone Phase nach deren Abklingen bzw. zeitlich zusammen mit deren Gegenregulation die Hyaluronidasehemmung auftritt.

Es kann demnach angenommen werden, dass nach einer Injektion von Acetylcholin+Prostigmin eine reaktive Katecholaminfreisetzung aus dem Nebennierenmark stattfindet. Versuche, die diese Annahmen durch Katecholaminbestimmungen der Nebenniere erhärten sollen werden zurzeit von anderer Seite durchgeführt. Ergebnisse hierüber liegen bisher noch nicht vor.

Diese Befunde zeigen, dass Versuche an intakten Ratten, die den Einfluss von Acetylcholin auf einen hyaluronidasehemmenden Effekt nachweisen sollen, keine stichhaltige Versuchsanordnung darstellen. Andererseits wird wahrscheinlich gemacht, dass Acetylcholinapplikationen durch eine reaktive Katecholaminfreisetzung zu

zu einer Hyaluronidasehemmung führen.

Nach den erwähnten Untersuchungen von S c h e u f e l e ¹⁴ und S c h l i e r f ⁸ tritt dann die Hyaluronidasehemmung im Anschluss an die durch Acetylcholin bewirkte Katecholaminfreisetzung auf. Diese Katecholaminausschüttung ist dabei Voraussetzung für den hyaluronidasehemmenden Effekt des Acetylcholin.

In ähnlicher Weise stellen wir uns auch die Wirkung des z.B. im G.T.50 (E n d l e r ³⁰, B a d e r ³¹, und E n d l e r, S c h m i d t-U e b e r r e i t e r ³²) enthaltenen Carbaminoylcholinchlorids mit prolongierter Acetylcholinwirkung zusammen mit der des Neostigmins als Cholinesterasehemmstoff vor, sofern man die Hyaluronidasehemmung als wichtigen Teileffekt der antirheumatischen Wirkung annehmen will.

Wie die Ergebnisse der Versuchsreihen (Tabellen 7 und 8, Abbildungen 3 und 4) zeigen, liegen hier die gleichen Verhältnisse wie beim Acetylcholin vor, dh. eine Hyaluronidasehemmung tritt nur bei intakten, dagegen nicht bei adrenalektomierten Ratten auf. Damit ist jedoch nicht bewiesen, dass es sich beim Dimethylaminoäthanol um eine Acetylcholin-stimulierende Substanz handelt. Wie bereits eingangs erwähnt, fällt die Hyaluronidasehemmung aller entsprechend wirksamen Substanzen bei adrenalektomierten Tieren aus, da sie der Katecholaminausschüttung aus den Nebennieren zur Entfaltung ihrer Wirksamkeit bedarf.

Zumindest kann gesagt werden, dass es sich beim Dimethylaminoäthanol um eine hyaluronidasehemmende Substanz handelt.

Sollte sich in anderweitigen Versuchen bestätigen lassen, dass diese Substanz ein Acetylcholinaccelerator ist, so dürfte der gleiche Wirkungsmechanismus wie beim Acetylcholin selbst hinsichtlich der Hyaluronidasehemmung vorliegen. Diese Frage muss jedoch auch nach unseren Versuchsergebnissen vorläufig offen bleiben.

Zusammenfassung

In Ergänzung der Versuchsergebnisse anderer Autoren wird in experimentellen Untersuchungen festgestellt, dass Acetylcholin (+Prostigmin als Cholinesterasehemmer) bei intakten Ratten eine hyaluronidasehemmende Wirkung entfaltet, die bei adrenaletomierten Tieren nicht auftritt. Im Zusammenhang mit bereits vorliegenden Befunden bezüglich des Wirkungsmechanismus hyaluronidasehemmender Stoffe wird angenommen, dass Acetylcholin zu einer reaktiven Katecholaminfreisetzung aus dem Nebennierenmark führt, ohne die eine Hyaluronidasehemmung nicht auftreten kann. Einerseits ist bekannt, dass die Hyaluronidasehemmung erst in einer auf die primäre Katecholaminwirkung folgende "Gegenregulationsphase" einsetzt, andererseits zeigen die Befunde der vorgelegten Arbeit, dass die primäre Einstellung einer vagalen Reaktionslage die Hyaluronidasehemmung nicht bedingt. Es ist vielmehr die Dynamik der Gegenregulation auf eine primäre sympatiktone Phase erforderlich.

Beim Dimethylaminoäthanol soll es sich um eine acetylcholin-accelerierende Substanz handeln. Sie führt in gleicher Weise wie Acetylcholin zu einer Hyaluronidasehemmung bei intakten Ratten, dagegen nicht bei adrenaletomierten Tieren.

Durch diesen Befund ist die Tatsache einer Acetylcholinacceleration weder zu beweisen noch zu widerlegen, da letztlich alle hyaluronidasehemmenden Substanzen zur Entfaltung ihrer Wirkung der Anwesenheit der Nebenniere bedürfen.

Literaturverzeichnis

- 1) Mathies, H.: Arzneim. Forsch. 8, 233 (1958)
- 2) Mathies, H.: in Vorbereitung
- 3) Mathies, H.: Zschr. f. d. ges. exper. Med. 131, 118 (1959)
- 4) Mathies, H. u. v. Werther, G.: Zschr. f. angew. Bäder- u. Klimaheilk. 5, 503 (1958)
- 5) Mathies, H.: Arch. f. phys. Ther., im Druck
- 6) Jankowski, A.: Diss. München 1957
- 7) Hartmann, M.: in Vorbereitung
- 8) Schlierf, G.: Diss. München, in Vorbereitung
- 9) Rösch, U.: Diss. München, in Vorbereitung
- 10) Domenjoz, R.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. 225, 14 (1955)
- 11) Jung, M.: Diss. München, in Vorbereitung
- 12) Sayers, G. u. Sayers, M.: Endocrinology 40, 256 (1947)
- 13) Mathies, H.: Arch. Internat. Pharmacodyn et ther., im Druck
- 14) Scheufele, R.: Diss. München 1958
- 15) Schmidt, D.: Diss. München, in Vorbereitung
- 16) Mathies, H.: Medicina experimentalis, eingereicht.
- 17) Vogel, M.: Diss. München, in Vorbereitung
- 18) Lignau, W.: Diss. München, in Vorbereitung
- 19) Mathies, H.: in Vorbereitung
- 20) Schwalbach, K.: Diss. München, in Vorbereitung
- 21) Mathies, H.: in Vorbereitung
- 22) Fellingner, K. u. Schmid, J.: Münch. Med. Wschr. 97, 524 (1955)
- 23) Marquardt, P., Meyer, H.J., Schumacher, H.: Arzn.Forsch. 7, 457 (1957)
- 24) Aris, J.G.: persönliche Mitteilung
- 25) Wilhelmi, G.: Zit. Domenjoz ¹⁰
- 26) Madinaveitia, J.: Biochemie J.32, 1806, (1938)

- 27) Gibian, H.: Erg. d. Enzymforsch. 13, 1 (1954)
- 28) Karg, H.: persönliche Mitteilung
- 29) Canalis, P.: Intern. Mschr. Anat. 4, 312 (1887 a)
- 30) Endler, F.: Wien. Med. Wschr. 107, 1023 (1957)
- 31) Bader, A.: Praxis, 46, 845 (1957)
- 32) Endler, F., Schmidt-Überreiter, E.: Wien, Med. Wschr. 104,
144 (1954)

Ich danke Herrn Professor Dr. W. Seitz für die Überlassung des
Themas und Herrn Dr. H. Mathies für die Anregung zu dieser Ar-
beit und die Unterstützung bei der Bearbeitung des Themas.
Herrn Dipl.-Math. K. Liebrich bin ich für die Durchführung der
statistischen Berechnungen dankbar.

Lebenslauf

Am 26. August 1918 wurde ich in Düsseldorf geboren. Nach vierjährigem Besuch der Volksschule trat ich in das Aloisiuskolleg in Bad Godesberg ein. Dort blieb ich bis zum Abschluss im Jahre 1938. Nach Absolvierung des Arbeitsdienstes wurde ich zur Wehrmacht eingezogen und diente sechs Jahre. Nach einer Verwundung erhielt ich im Jahre 1943 die Genehmigung mit dem Medizinstudium zu beginnen. Ich studierte ein Semester in Berlin und drei Semester in Breslau, wo ich auch die Ärztliche Vorprüfung ablegte. Anschliessend musste ich wieder ins Feld. Nach Kriegsende und Entlassung aus der Gefangenschaft nahm ich mein Studium in Bonn wieder auf. Unterbrochen von einigen Jahren Tätigkeit in der pharmazeutischen Industrie studierte ich dort sechs Semester und anschliessend noch ein Semester in Heidelberg und zwei Semester in München. Hier legte ich im Herbst 1958 das medizinische Staatsexamen ab.

